

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

20 AUG 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 2月20日

出願番号

Application Number:

特願2002-044000

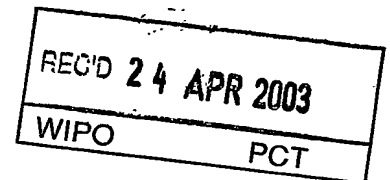
[ST.10/C]:

[JP2002-044000]

出願人

Applicant(s):

吉田 稔
西野 憲和
堀之内 未治

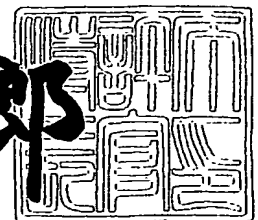


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3022274

【書類名】 特許願

【整理番号】 SEN-A0123

【提出日】 平成14年 2月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県川口市安行 6 5 5 - 2 1

 【氏名】 吉田 稔

【発明者】

 【住所又は居所】 福岡県北九州市若松区畠田 1 - 6 - 6

 【氏名】 西野 憲和

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江東区越中島 1 - 3 - 1 6 - 4 0 3

 【氏名】 堀之内 末治

【特許出願人】

 【住所又は居所】 埼玉県川口市安行 6 5 5 - 2 1

 【氏名又は名称】 吉田 稔

【特許出願人】

 【住所又は居所】 福岡県北九州市若松区畠田 1 - 6 - 6

 【氏名又は名称】 西野 憲和

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都江東区越中島 1 - 3 - 1 6 - 4 0 3

 【氏名又は名称】 堀之内 末治

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プールの可否】 要

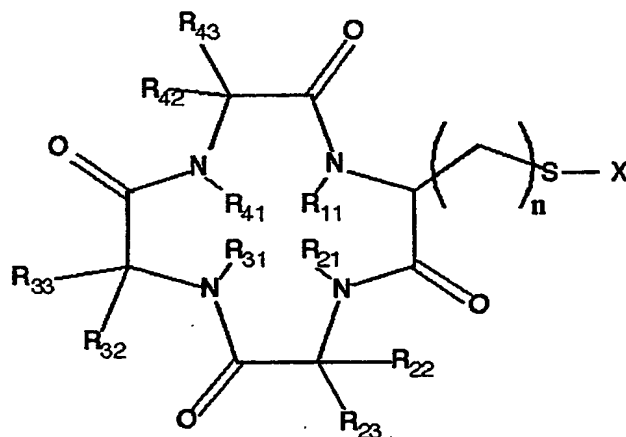
【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の一般式（1）で示されたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤。

【化1】

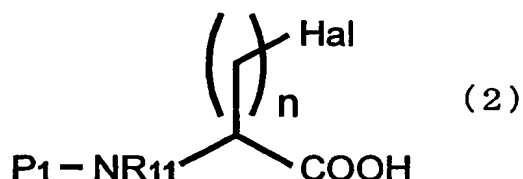


(1)

〔式中、 R_{11} , R_{21} , R_{31} , R_{41} はそれぞれ独立して水素またはメチル基を示す。 R_2 , R_{23} , R_{32} , R_{33} , R_{42} , R_{43} はそれぞれ独立して水素、炭素数1～6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した炭素数1～6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基、または非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した非芳香族環状アルキル基のいずれかを示す。また、 R_{21} と R_{22} , R_{22} と R_{23} , R_{31} と R_{32} , R_{32} と R_{33} , R_{41} と R_{42} , R_{42} と R_{43} は、それぞれ結合を持たず非環状構造を示すか、または鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基、炭素数1～6の分岐鎖を有する鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基、もしくは、炭素数1～6の環構造を備えた鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基を介して結合した環構造を示す。Xは、水素、当該Xよりも左に示す構造体と同一構造、硫黄原子を含む任意の構造体であって当該硫黄原子と上記式1中の硫黄原子とがジスルフィド結合を介して結合し得る置換基を有することもあるアルキル基もしくはアリール基、または前記 R_{22} , R_{23} , R_{32} , R_{33} , R_{42} , または R_{43} の末端に結合し該Xの左に位置する硫黄原子と分子内ジスルフィド結合を形成している硫黄原子のいずれかを示す。〕

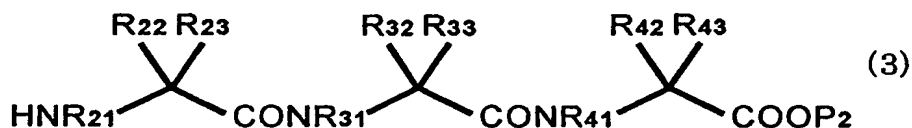
【請求項 2】 一般式 (2)

【化 2】



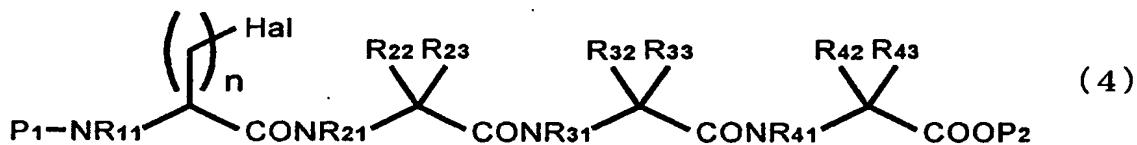
(式中、 n は一般式 (1) で定義したと同様であり、Hal はハロゲン原子を表し、 P_2 はアミノ基の保護基を表す) で示される化合物を、一般式 (3)

【化 3】



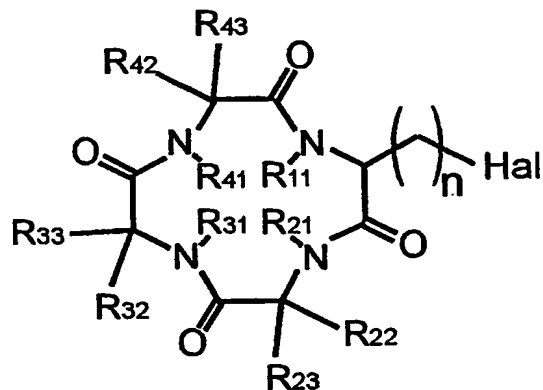
(式中、 R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , 及び R_{43} は、一般式 (1) で定義したと同様であり、 P_2 はカルボキシル基の保護基を表す) で示される化合物とペプチド結合剤の存在下で反応させ、一般式 (4)

【化 4】



(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び Hal は、前記で定義したと同様である) で示される化合物を得、次いで前記一般式 (4) で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、もしくは加水分解により、 P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させ、一般式 (5)

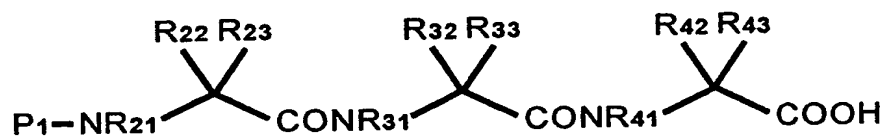
【化5】



(5)

(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び Hal は、前記で定義したと同様である) で示される化合物を得るか、または一般式 (6)

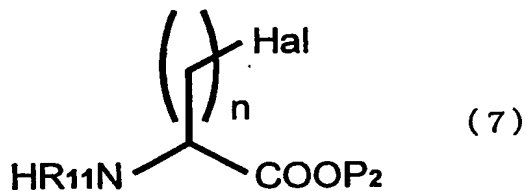
【化6】



(6)

(式中、 R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , 及び P_1 は、前記で定義したと同様である) で示される化合物を、一般式 (7)

【化7】



(7)

(式中、 n , R_{11} , P_2 , 及び Hal は、前記で定義したと同様である) で示される化合物とペプチド結合剤存在下で反応させ、一般式 (8)



(8) で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、フルオリドアニオン処理、もしくは加水分解により P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在

•



9

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

びその製造方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

真核生物のクロマチン構造と遺伝子の発現は、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) によるヒストンのアセチル化と、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) による脱アセチル化によって調節されている。HDACの阻害剤ががん細胞の分化や、アポトーシスを誘導することが以前から知られ、制がん剤としての応用が期待されている (Marks, P. A., Richon, V. M., and Rifkind, R. A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. J. Natl. Cancer Inst. 92, 1210-1216; Yoshida, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1995). Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. Bioessays 17, 423-430)。また、HDAC阻害剤は制がん薬剤以外にも、例えば自己免疫疾患、皮膚病、感染症 (Darkin-Rattray et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13143-13147, 1996) などの治療・改善薬、さらには遺伝子治療におけるベクター導入の効率化 (Dion et al., Virology 231, 201-209, 1997)、導入遺伝子の発現亢進 (Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5798-5803, 1997) など様々な応用も試みられている。

【 0 0 0 3 】

実際、米国では動物実験で制がん剤としての有効性を示すいくつかのHDAC阻害剤 (Nakajima, H., Kim, Y. B., Terano, H., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1998). FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. Exp. Cell Res. 241, 126-133; Saito, A., Yamashita, T., Mariko, Y., Nosaka, Y., Tsuchiya, K., Ando, T., Suzuki, T., Tsuruo, T., and Nakanishi, O. (1999). A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597) の臨床研究が開始されている。HDACには10種類以上のサブタイプが存在するが、近年、特定のHDACサブタイプとがんとの密接な関係がわかってきた。例えば、発がんの抑制に極めて重要な役割を果たすがん抑制遺伝子p53の機能発現にp53自身のアセチル化が重要であり (Ito

, A., Lai, C. H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M. H., Appella, E., and Yao, T. P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* 20, 1331-1340)

、その機能阻害にHDAC1やHDAC2が関わること(Juan, L. J., Shia, W. J., Chen, M. H., Yang, W. M., Seto, E., Lin, Y. S., and Wu, C. W. (2000). Histone Deacetylases Specifically Down-regulate p53-dependent Gene Activation. *J. Biol. Chem.* 275, 20436-20443)、前骨髄球性白血病 (APL) の発症に関わる蛋白質PML-RARやPLZF-RAR、リンパ腫の発症に関わるBcl-6等のがん遺伝子が、核内コリプレッサーを介してHDAC4などをリクルートし、正常な分化に必要な遺伝子群の発現を抑制することで発がんに至ることなどが示されている(Dhordain P., Albagli, O., Lin, R. J., Ansieau, S., Quief, S., Leutz, A., Kerckaert, J. P., Evans, R. M., and Leprince, D. (1997). Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10762-10767; Grignani, F., De, M. S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F., Zamir, I., Seiser, C., Grignani, F., Lazar, M. A., Minucci, S., and Pelicci, P. G. (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 815-818; He, L. Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Ruthardt, M., Zelent, A., and Pandolfi, P. P. (1998). Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nature Genet.* 18, 126-135; Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W. J., and Evans, R. M. (1998). Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 811-814)。

【 0 0 0 4 】

その一方で、組織特異的に発現するHDACサブタイプの中には、正常な組織の発生や分化に重要な役割を果たすものが存在することが知られ(McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J., and Olson, E. N. (2000). Signal-dependent nuclear

export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. Nature 408, 106-111; Verdel, A., and Khochbin, S. (1999). Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. J. Biol. Chem. 274, 2440-2445)、これらを阻害しないためにはサブタイプ特異的な阻害剤の開発が必要であると考えられる。

【 0 0 0 5 】

HDAC特異的阻害剤としてはトリコスタチン A (TSA) が有名である (Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. J. Biol. Chem. 265, 17174-17179)。TSAはヒドロキサム酸基がHDAC活性ポケット内で亜鉛に配位することで阻害活性を示す。しかし、TSAは血中で不安定である上にヒドロキサム酸のキレート作用が強力なために他の必須な金属イオンとキレートを形成してしまうなどの理由で、抗がん剤として実際の使用には至っていない。これに対し、最近になってFK228のジスルフィド結合の還元により生じるチオール基が、HDAC活性ポケット内の亜鉛と配位する活性基となり、HDACを阻害し得ることが示された。また、天然界から環状テトラペプチド構造を有し、活性基としてエポキシケトンを持つHDAC阻害剤が複数単離されている。このような知見から、酵素認識に対する環状テトラペプチド構造の有用性が示唆されているが(前掲Yoshidaら, 1995)、これまでの阻害剤は安定性などの種々の点で医薬品として十分に満足できるレベルには達したものはない。そこでそれらの問題点を解決した薬剤の開発が強く望まれている。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本願発明者らは、環状テトラペプチド構造を有する新規なHDAC阻害剤およびその製造方法を提供することを目的とする。

【 0 0 0 7 】

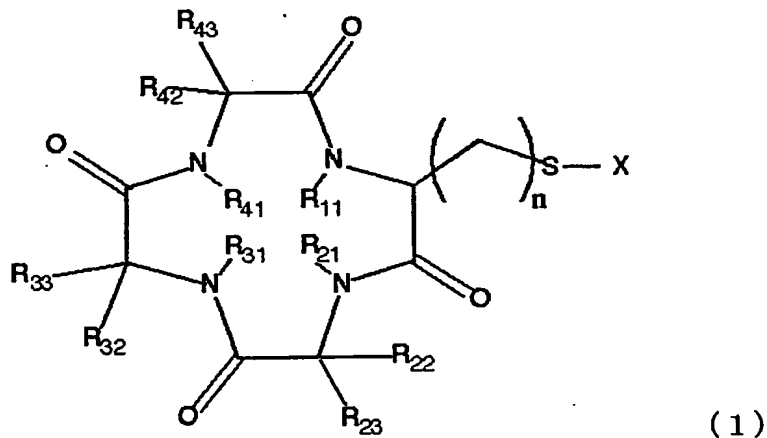
【課題を解決するための手段】

上記課題に鑑み、本願発明者らは、チオール基およびそのジスルフィド結合を

有する環状テトラペプチド構造を有する化合物を合成し、そのHDAC阻害活性を解析した結果、ジスルフィド結合を有する化合物はin vitroでは酵素に対してはそれほど強いHDAC阻害活性を示さないが、還元剤であるジチオスレイトールを共存させてチオール体とすると強いHDAC阻害活性を有することが確認された。一方、細胞レベルでのジスルフィド体の活性はTSAやチオール体と同様の強い活性が観察された。すなわち、ジスルフィド体は細胞内に取り込まれた後、細胞内還元でジスルフィド結合が開裂して強い活性が誘導されるHDAC阻害剤のプロドラッグとして有用であることが示された。また、このようにチオール基を保護することにより化合物の血清中での安定性が増すとともに、保護基(-SX)に様々な機能化合物を結合させることにより、HDAC阻害剤以外にも所望の活性を発揮し得る化合物を連結し得る化合物であることを見出した。すなわち、本発明の新規なHDAC阻害剤は、以下の一般式(1)で示されたヒストン脱アセチル酵素阻害剤である。

【0008】

【化10】



【0009】

式中、R₁₁, R₂₁, R₃₁, R₄₁はそれぞれ独立して水素またはメチル基を示す。R₂₂, R₂₃, R₃₂, R₃₃, R₄₂, R₄₃はそれぞれ独立して水素、炭素数1~6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した炭素数1~6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基、または非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した非芳香族環状アルキル基のいずれかを示す。また、R₂₁とR₂₂, R₂₂とR₂₃, R₃₁とR₃₂, R₃₂とR₃₃

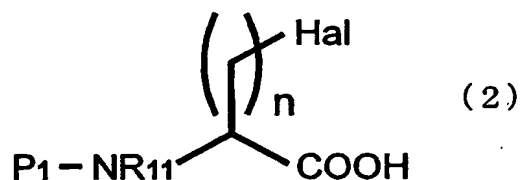
、 R_{41} と R_{42} 、 R_{42} と R_{43} は、それぞれ結合を持たず非環状構造を示すか、または鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基、炭素数1～6の分岐鎖を有する鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基、もしくは、炭素数1～6の環構造を備えた鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基を介して結合した環構造を示す。 X は、水素、当該 X よりも左に示す構造体と同一構造、硫黄原子を含む任意の構造体であって当該硫黄原子と上記式1中の硫黄原子とがジスルフィド結合を介して結合し得る置換基を有することもあるアルキル基もしくはアリール基、または前記 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{32} 、 R_{33} 、 R_{42} 、または R_{43} の末端に結合し該 X の左に位置する硫黄原子と分子内ジスルフィド結合を形成している硫黄原子のいずれかを示す。

【0010】

また、本発明は、HDAC阻害剤の製造方法は、一般式(2)

【0011】

【化11】

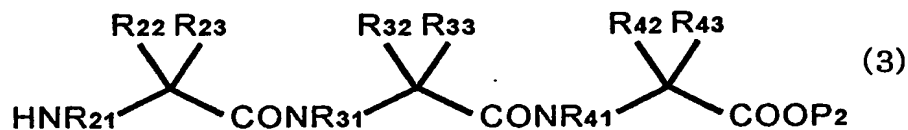


【0012】

(式中、 n は一般式(1)で定義したと同様であり、 Hal はハロゲン原子を表し、 P_2 はアミノ基の保護基を表す)で示される化合物を、一般式(3)

【0013】

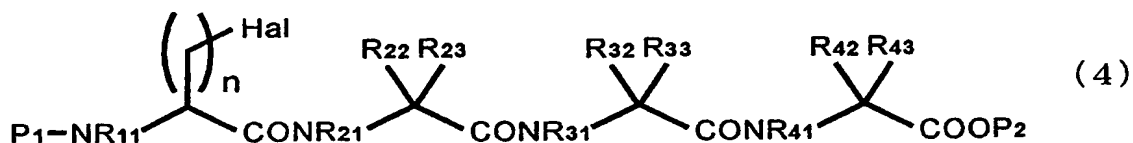
【化12】



【0014】

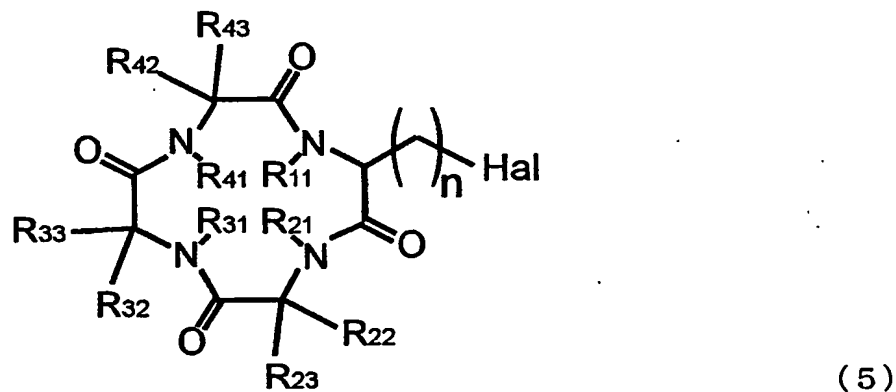
(式中、 R_{11} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{33} 、 R_{41} 、 R_{42} 、及び R_{43} は、一般式(1)で定義したと同様であり、 P_2 はカルボキシル基の保護基を表す)で示される化合物とペプチド結合剤の存在下で反応させ、一般式(4)

【化 1 3】



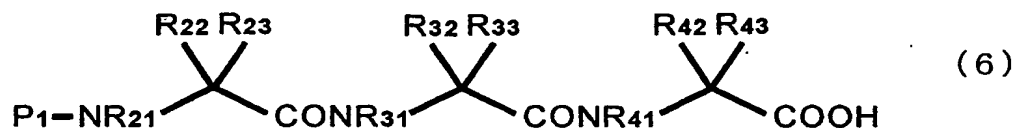
(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び Hal は、前記で定義したと同様である)で示される化合物を得、次いで前記一般式(4)で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、もしくは加水分解により、 P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させ、一般式(5)

【化 1 4】



(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び Hal は、前記で定義したと同様である) で示される化合物を得るか、または一般式 (6)

【0019】

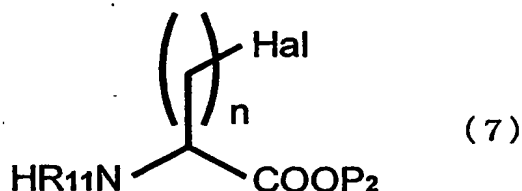


【0 0 2 0】

(式中、 R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , 及び P_1 は、前記で定義したと同様である)で示される化合物を、一般式(7)

【0 0 2 1】

【化 1 6】



【0 0 2 2】

(式中、 n , R_{11} , P_2 , 及び Hal は、前記で定義したと同様である)で示される化合物とペプチド結合剤存在下で反応させ、一般式(8)

【0 0 2 3】

【化 1 7】



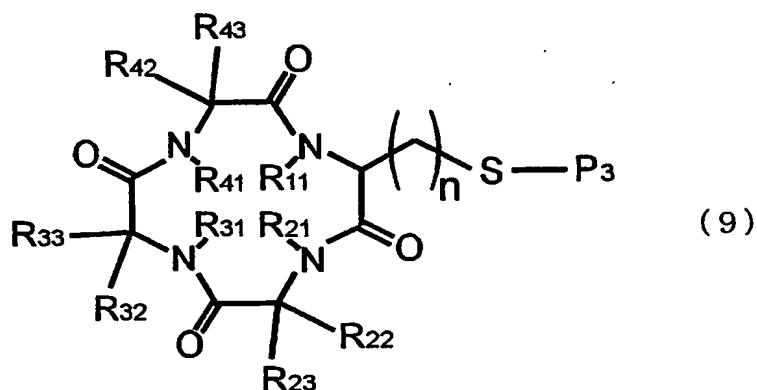
【0024】

(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び Hal は、前記で定義したと同様である)で示される化合物を得、次いで一般式 (8) で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、フルオリドアニオン処理、もしくは加水分解により P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させて、上記一般式 (5) で示される化合物を得、次いで一般式 (

5) で示される化合物を、硫黄原子を含む試薬と反応させ、一般式 (9)

【0025】

【化18】



【0026】

(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , 及び R_{43} は、前記で定義したと同様であり、 P_3 はスルフィドリル基の保護基を表す) で示される化合物を得、次いで一般式 (IX) で示される化合物をアンモニア及び酸化剤で処理することを含まれる。

【0027】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について図面に基づき詳細に説明する。

本発明のヒストン脱アセチル酵素阻害剤は、上記の一般式 (1) で示すことができる。

【0028】

上記式 (1) 中、 R_{11} , R_{21} , R_{31} , R_{41} はそれぞれ独立して水素またはメチル基とすることができる。また、 R_{22} , R_{23} , R_{32} , R_{33} , R_{42} , R_{43} は、それぞれ独立して水素、炭素数1~6の直鎖アルキル基、または非芳香族環状アルキル基のいずれかとすることができ、ここで、炭素数1~6の直鎖アルキル基および非芳香族環状アルキル基には、非芳香族環状アルキル基、芳香環もしくは置換基を有する芳香環が結合していてもよい。また、 R_{21} と R_{22} , R_{22} と R_{23} , R_{31} と R_{32} , R_{32} と R_{33} , R_{41} と R_{42} , R_{42} と R_{43} は、それぞれ結合を持たず非環状構造をとってもよく、また鎖

長炭素数1～5の直鎖アルキレン基、炭素数1～6の分岐鎖を有する鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基、もしくは炭素数1～6の環構造を備えた鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基を介して結合した環構造を形成していてもよい。この環状テトラペプチド構造部分はHDACのポケットをふさぐキャップとして機能し得ると考えられるため、このキャップ構造として機能し得る範囲で、上記炭素数1～6の直鎖アルキル基、芳香族環状アルキル基、これらの置換基となり得る芳香族を任意に選択することができる。

【 0 0 2 9 】

また、式（1）中、Xを水素とし、隣り合う硫黄原子とともに直接HDAC阻害活性を示すチオール基を形成させてもよい。ただし、Xを水素とし、チオール基を露出させた場合には、生体内で不安定となる。そのため、Xを水素とした場合には、ドラッグデリバリーシステムなどのように所望の部位まで安定に輸送し得る手段と組み合わせることが好ましい。また、HDAC阻害活性を有するチオール基の安定性を高めるために、Xには生体内で代謝され、生体に有害でない置換基を用いることが好ましい。このような置換基としては、当該Xと隣り合う硫黄原子とジスルフィド結合を形成し得る硫黄原子を備えた置換基とすることが好ましく、置換基自身で何らかの効能を示すものであってもよく、また、単に保護基としての機能を備えているものであってもよい。このような硫黄原子を含む置換基としては、当該Xよりも左に示す構造体と同一構造体、硫黄原子を含む任意の構造体であって当該硫黄原子と上記式（1）中の硫黄原子とジスルフィド結合を介して結合し得るアルキル基もしくはアリール基、または前記 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{32} 、 R_{33} 、 R_{42} 、または R_{43} の末端に結合し該Xの左に位置する硫黄原子と分子内ジスルフィド結合を形成している硫黄原子などとすることができる。ここで、置換基を当該Xよりも左に示す構造体と同一構造体とした場合には、ダイマー構造となり、生体内における代謝によりジスルフィド結合が切断されて、2分子の活性を有するHDAC阻害剤が遊離することになる。また、硫黄原子を有する任意のアルキル基もしくはアリール基は、さらに置換基などを備えていてもよく、また、HDAC阻害剤と同じあるいは異なる効能を発揮し得る構造体としてもよい。

【 0 0 3 0 】

式(1)中、環nはHDAC阻害活性を有する範囲で選択することができ、例えば、nは好ましくは4～7、最も好ましくは5である。この環状テトラペプチド構造から硫黄原子までの炭素数nからなる炭素鎖は、HDACの活性ポケット部分に侵入し、この炭素鎖先端の活性チオール基をHDACのポケット内の亜鉛分子に接触させHDACを阻害する機能を有すると考えられる。

【0031】

なお、本発明のHDAC阻害剤の代表的な例を図1から3に示すが、本発明のHDAC阻害剤はこれらに限定されるものではない。

【0032】

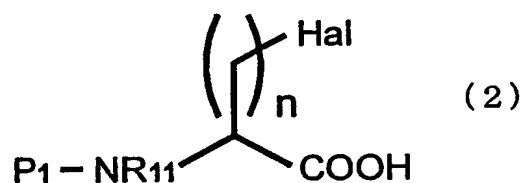
また、以下に本発明のHDAC阻害剤の製造方法について説明する。本実施形態のHDAC阻害剤は、2-アミノ-n-ハロアルカン酸を原料として以下の通り製造することができる。なお、 R_{11} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{31} 、 R_{32} 、 R_{33} 、 R_{41} 、 R_{42} 、 R_{43} 、およびnなどの定義は上記HDAC阻害剤の説明で述べた定義と同一であるので、ここではその説明を省略する。

【0033】

本発明は、HDAC阻害剤の製造方法の第一の態様は、2-アミノ-n-ハロアルカン酸のアミノ基に保護基 P_1 を備えた以下の一般式(2)を原料として製造する方法である。具体的には、一般式(2)

【0034】

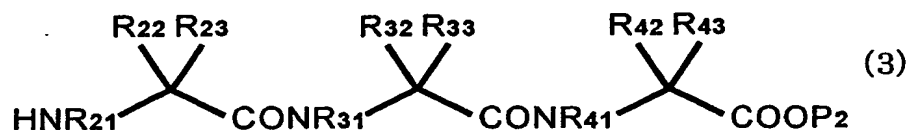
【化19】



【0035】

で示される化合物、一般式(3)

【0036】

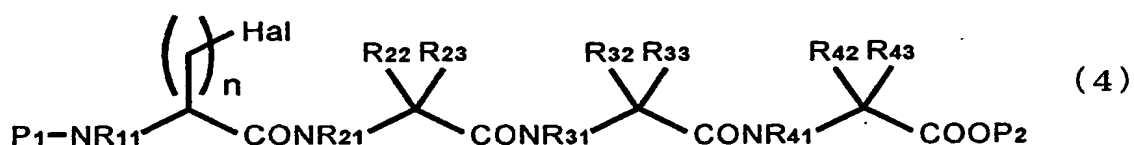


【 0 0 3 7 】

で示される化合物とペプチド結合剤の存在下で反応させ、一般式(4)

【0038】

【化 2 1】



【0039】

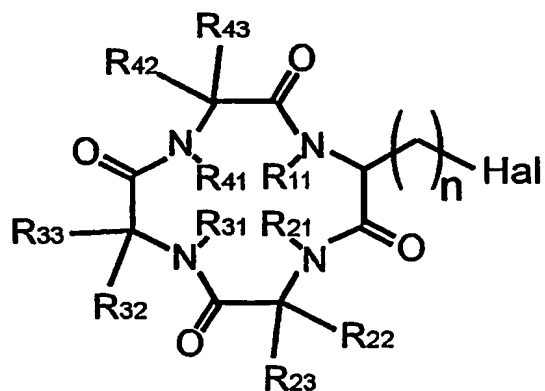
で示される化合物を得る。これら式中、Hal はハロゲン原子を表し、このハロゲン原子としては塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子のいずれを用いもよい。P₂ はアミノ基の保護基を表す。

【 0 0 4 0 】

次いで前記一般式（４）で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、もしくは加水分解により、 P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させ、一般式（５）

【 0 0 4 1 】

【化 2 2】



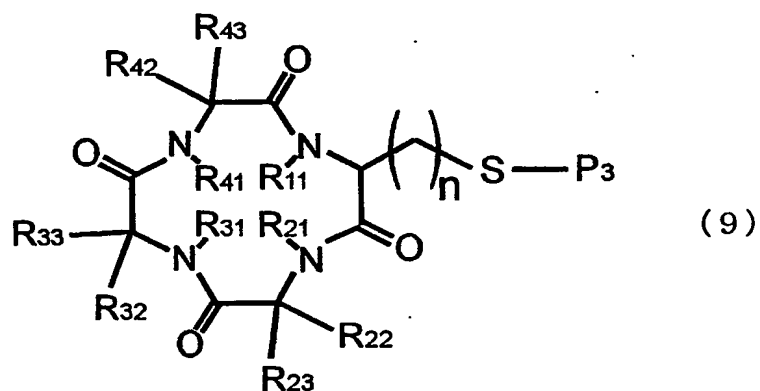
(5)

【0042】

で示される化合物を得る。次いで、一般式（5）で示される化合物を、硫黄原子を含む試薬と反応させ、一般式（9）

【0043】

【化23】



【0044】

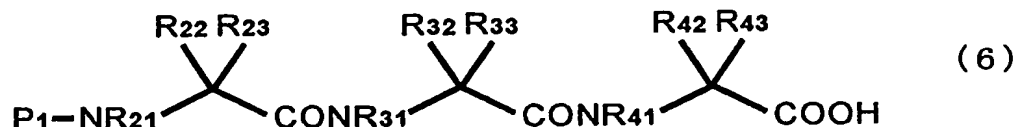
で示される化合物を得、次いで一般式（9）で示される化合物をアンモニア及び酸化剤で処理することにより、ジスルフィド結合を有するプロドラッグ型の化合物（ダイマー型、ハイブリッド型）が形成される。なお、式（9）中、 P_3 はスルフィドリル基の保護基を表す。これを活性を有するチオール型の化合物に分離するには、還元剤またはジスルフィド結合を消化し得る酵素により処理すればよい。

【0045】

本発明のHDAC阻害剤の製造方法の第二の態様は、2-アミノ-n-ハロアルカン酸のカルボキシル基に保護基 P_2 を備えた以下の一般式（7）を原料として製造する方法である。具体的には、一般式（6）

【0046】

【化24】

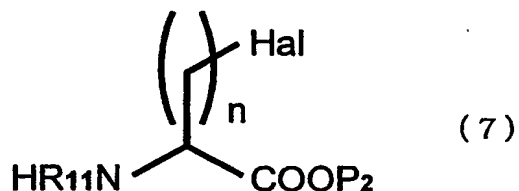


【0047】

で示される化合物を、一般式(7)

【0048】

【化 2 5】

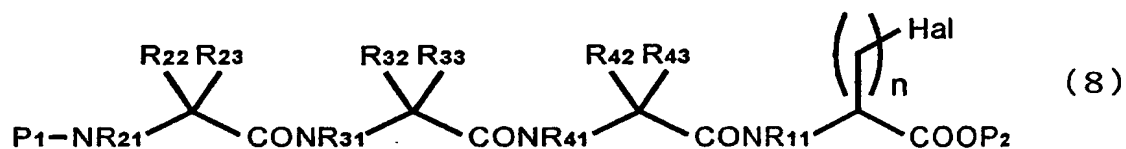


【 0 0 4 9 】

で示される化合物とペプチド結合剤存在下で反応させ、一般式(8)

【0050】

【化 2 6】

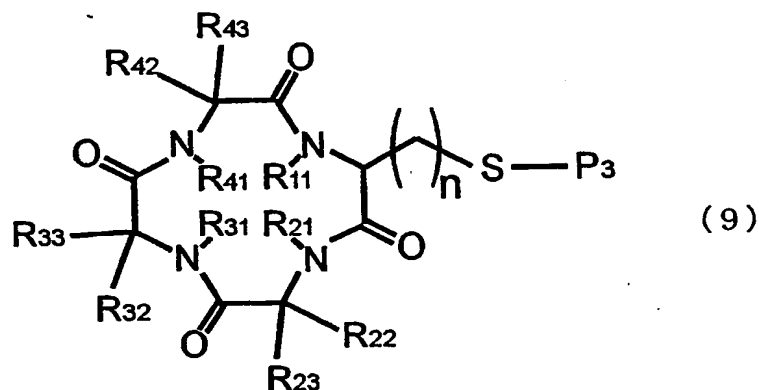


【0051】

で示される化合物を得る。次いで一般式(8)で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、フルオリドアニオン処理、もしくは加水分解により P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させて、上記一般式(5)で示される化合物を得る。次いで一般式(5)で示される化合物を、硫黄原子を含む試薬と反応させ、一般式(9)

【0052】

【化 27】



【0053】

で示される化合物を得、次いで一般式(9)で示される化合物をアンモニア及び酸化剤で処理することによりジスルフィド結合を有するプロドラッグ型の化合物(ダイマー型、ハイブリッド型)が形成される。上記第一の態様と同様に、活性を有するチオール型の化合物に分離するには、還元剤またはジスルフィド結合を消化し得る酵素により処理すればよい。

【0054】

上記HDAC阻害剤は、種々のHDACのうち、HDAC 1, 4 に対して選択的に強い阻害活性を示す。そのため、本HDAC阻害剤は、HDAC 1, 4 に起因した疾患の治療薬として有用になる。この疾患としては、がん以外にも、HDAC 1, 4 が関与した自己免疫疾患、皮膚病、感染症などを含めることができる。また、本HDAC阻害剤は、上記疾患の治療薬への応用だけでなく、遺伝子治療におけるベクター導入の効率化、導入遺伝子の発現亢進などのような遺伝子治療の補助剤あるいは促進剤として応用してもよい。

【0055】

このような医薬として本HDAC阻害剤を製剤化する場合には、必要に応じて充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤を用いることができる。また、この医薬製剤中に着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を医薬製剤中に含有させてもよい。この医薬製剤としては各種の形態が治療目的に応じて選択でき、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

【0056】

【実施例】

本実施例で示す化合物の合成工程の全体の流れを図1、2に示し、H-L-Ab7-OHを出発原料として各合成工程について以下に詳細に説明する。なお、ここでは2-amino-7-bromoheptanoic acidを「Ab7」と、2-amino-7-acetyltioheptanoic acidを「Am7(Ac)」と、2-amino-7-mercaptoheptanoic acidを「Am7」と、sulfide of 2-amino-7-mercaptoheptanoic acidを「Am7(-)」と、2-amino-8,9-dimercapto(S^9 -2'-nitro-N,N'-dimethyl benzamide)を「Am7(E11)」と、2-amino-8,9-dimercapto-11-hydroxyundecanoic acidを「Am7(SMEt)」と、2-amino-8,9-dimercapto(S^9 -2'-pyridyl) nonanoic acidを「Am7(S2Py)」と、2-amino-8,9-dimercapto(S^9 -4'-pyridyl) nonanoic acidを「Am7(S4Py)」と略す。また、合成化合物であるSulfur-containing cyclic peptidesを「SCOP」と略して示す。

【0057】

実施例1. Boc-L-Ab7-OHの合成

H-L-Ab7-OH (7.3 g, 32.4 mmol) を水 : ジオキサン = 1 : 1溶液 (30 ml, v/v) に溶解し、氷冷下(Boc)₂O (7.68 g, 35.6 mmol) 及びトリエチルアミン (6.72 ml, 48.6 mmol) を加え5時間攪拌した。反応液を留去後、エーテルで洗い、水相をクエン酸で酸性にして酢酸エチルで逆抽出した。MgSO₄で乾燥後、酢酸エチルを留去し、減圧下乾燥後に油状の標記化合物 (10.4 g, 32.4 mmol, 収率 100%) を得た。

【0058】

実施例2. Boc-L-Ab7-NHMeの合成

Boc-L-Ab7-OH (326 mg, 1.0 mmol), 塩酸モノメチルアミン (81 mg, 1.2 mmol), HOBt · H₂O (184 mg, 1.2 mmol) のDMF (3 ml) 溶液に氷冷下でトリエチルアミン (0.17 ml, 1.2 mmol) 及びDCC (247 mg, 1.2 mmol) を加えた。15時間攪拌後、DMFを留去し、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (3.6 x 15 cm, クロロホルム) で精製し、エーテル / 石油エーテル (1:10) を加えて固化し、白色粉末の標記化合物

(250 mg, 0.74 mmol, 収率 74%) を得た。TLC: $R_f = 0.58$ (CHCl_3 / $\text{MeOH} = 9 / 1$)

【 0 0 5 9 】

実施例 3. Boc-L-Am7(Ac)-NHMe の合成

Boc-Ab7-NHMe (125 mg, 0.37 mmol) の DMF (2 ml) 溶液に、チオ酢酸カリウム (64 mg, 0.56 mmol) を加えて 3 時間反応させた。DMF を留去し、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した後、 MgSO_4 で乾燥、濃縮、エーテル / 石油エーテル (1:10) を加えて固化し、白色粉末の標記化合物 (120mg, 0.36 mmol, 収率 97%) を得た。TLC: $R_f = 0.57$ (CHCl_3 / $\text{MeOH} = 9 / 1$)

【 0 0 6 0 】

実施例 4. Boc-L-Am7(-)-NHMe SS dimer の合成

Boc-Am7(Ac)-NHMe (60 mg, 0.18 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (20 eq.) を加え、24 時間攪拌した。反応液を濃縮後、生成した SS dimer をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (1.5×30 cm, 1% メタノール / クロロホルム) で精製し、白色粉末の標記化合物 (43 mg, 0.11 mmol, 収率 61%) を得た。HPLC 保持時間、8.5 min, HRMS (FAB, ditiiodiethanol), 579.3293 [M+H], $\text{C}_{26}\text{H}_{51}\text{O}_6\text{N}_4\text{S}_2$ (579.3250).

【 0 0 6 1 】

実施例 5. Boc-L-Am7(S4Py)-NHMe の合成

Boc-Am7(Ac)-NHMe (60 mg, 0.18 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液に 4,4'-ジチオジピリジン (79 mg, 0.36 mmol) 及びメタノール性アンモニア (20 eq.) を加え、5 時間攪拌した。反応液を濃縮後、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (1.5×30 cm, クロロホルム) で精製し、凍結乾燥を行い、標記化合物 (43 mg, 0.11 mmol, 収率 61%) を得た。HPLC 保持時間、5.6 min, HRMS (FAB, ditiiodiethanol), 400.1766 [M+H], $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_3\text{N}_3\text{S}_2$ (400.1729).

【 0 0 6 2 】

実施例 6. Boc-L-Ab7-Obzl の合成

Boc-L-Ab7-OH (4.05 g, 12.5 mmol) を DCM (20 ml) に溶解し、氷冷下ベンジ

ルアルコール (1.55 ml, 15.0 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン (153 mg, 1.25 mmol) 及びDCC (3.09 g, 15.0 mmol) を加え8時間攪拌を行った。反応液を留去後、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (5×20 cm, 20% 酢酸エチル / ヘキサン) で精製し、油状の標記化合物 (4.29 g, 10.4 mmol, 収率 83%) を得た。TLC: R_f = 0.49 (酢酸エチル / ヘキサン = 1 / 4)

【 0 0 6 3 】

実施例 7. Boc-L-Ile- L-Pro-Obzlの合成

Boc-L-Pro-OH (1.08 g, 5.0 mmol) とベンジルブロミド (0.893 ml, 75 mmol) とをDMF (10 ml) 中、氷冷下でトリエチルアミン (10.5 ml, 75 mmol) 存在下で反応させて、生じたBoc-L-Pro-OBzlを油状物として得た。これを氷冷下2 N HCl / ジオキサン (5 eq.) で3時間反応させて、H-L-Pro-OBzl · HClを得た。

Boc-L-Ile-OH · 1/2 H₂O (1.39 g, 6.0 mmol), H-D-Pro-OBzl · HCl (956 mg, 4.0 mmol) 及びHOBt · H₂O (613 mg, 4.0 mmol) のDMF (10 ml) 溶液に氷冷下でDCC (1.24 g, 6.0 mmol) 及びトリエチルアミン (0.70 ml, 4.0 mmol) を加えた。8時間攪拌後、DMFを留去し、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、油状の標記化合物 (1.63 g, 3.38 mmol, 収率 85%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

【 0 0 6 4 】

実施例 8. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-Obzlの合成

Boc-L-Ile-L-Pro-OBzl (1.63 g, 3.38 mmol) をTFA (5 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応終了後TFAを留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ile-L-Pro-OBzl · TFA を得た。これをDMF (8 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-OH (1.50 g, 5.07 mmol) を加え、続いて氷冷下HBTU (1.92 g, 5.07 mmol), HOBt · H₂O (518 mg, 3.38 mmol) 及びトリエチルアミン (2.37 ml, 16.9 mmol) を加え、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナ

トリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.44 g, 2.42 mmol, 収率 72%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

【 0 0 6 5 】

実施例 9. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OBzlの合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OBzl (1.44 g, 2.42 mmol) をメタノール (12 ml) に溶解し、5% Pd-C (150 mg) 存在下接触還元を行った。5時間後、Pd-C触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OH・TFAを得た。

Boc-L-Ab7-OBzl (1.29 g, 3.12 mmol) をTFA (10 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応終了後TFAを留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ab7-OH・TFAを得た。これをDMF (16 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OH (1.21 g, 2.40 mmol)を加え、続いて氷冷下HBTU (1.18 g, 3.12 mmol), HOBt・H₂O (368 mg, 2.40 mmol) 及びトリエチルアミン(1.34 ml, 9.6 mmol)を加え、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール/クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.20 g, 1.47 mmol, 収率 61%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

【 0 0 6 6 】

実施例 10. H-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OH・TFAの合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OBzl (1.20 g, 1.47 mmol) をメタノール (7.5 ml) に溶解し、Pd-C触媒 (130 mg) 下、接触還元を行った。5時間後、Pd-C触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OHを得た。これを TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応液を留去後、エーテル / 石油エーテル (1:10) を加えて固化し、減圧下乾燥後に標記化合物 (770 mg, 1.02 mmol, 収率 69%) を得た。

【 0 0 6 7 】

実施例 11. Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-)の合成

H-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Ab7-OH·TFA (770 mg, 1.02 mmol), HATU (388 mg, 1.53 mmol) 及び DIEA (0.71 ml) を 5 分割して 30 分毎に DMF (1000 ml) に加えて、環化反応を行った。2 時間後溶媒を留去して残渣を酢酸エチルに取り、10% クエン酸水溶液、4% NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄し、MgSO₄ で乾燥した。酢酸エチルを留去して残った油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール/クロロホルム) で精製し、フォーム状物 130 mg (21%) を得た。HPLC 保持時間、8.20 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 593 [M+H], (593.2).

【 0 0 6 8 】

実施例 1 2. Cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) (25 mg, 0.042 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (9.59 mg, 0.084 mmol) を加えて 3 時間反応させた。DMF を留去し、残渣を酢酸エチルに取り 10% クエン酸水溶液、4% NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した後、環化反応後と同様に生成したチオエステルを単離精製して 19 mg (76%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、8.20 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 589 [M+H], (589.3).

【 0 0 6 9 】

実施例 1 3. Cyclo(-L-Am7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) (SS-dimer : SCOP 296) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) (19 mg, 0.0322 mmol) を温めた DMF (2 ml) 溶液に溶かし、メタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去した。溶媒留去後 DMF (2 ml) に溶かし、1 M I₂ (エタノール) 0.04 ml を加えて酸化を行った。生成した SS dimer を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製した。水を加えて白色粉末として得た。収量 7.4 mg (42%)。HPLC 保持時間、14.1 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1091.5648 [M+H], C₅₆H₈₃O₁₀N₈S₂ (1091.5674).

【 0 0 7 0 】

実施例 1 4. Boc-L-Ile-DL-Pip-Obzl の合成

Boc-DL-Pip-OH (2.29 g, 10 mmol) とベンジルブロミド (1.79 ml, 15 mmol)

とをDMF (20 ml) 中でトリエチルアミン (2.1 ml, 15 mmol) 存在下で反応させて、生じたBoc-DL-Pip-OBzlを油状物として得た。これを2 N HCl / ジオキサン (5 eq.) で3時間反応させて、H-DL-Pip-Obzl · HClを得た。

Boc-L-Ile-OH · 1/2 H₂O (2.47 g, 10.7 mmol), H-D-Pro-OBzl · HCl (2.28 g, 8.9 mmol) 及びHOBt · H₂O (1.36 mg, 8.9 mmol) のDMF (20 ml) 溶液に氷冷下でDCC (2.20 g, 10.7 mmol) 及びトリエチルアミン (1.25 ml, 8.9 mmol) を加えた。8時間攪拌後、DMFを留去し、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、油状の標記diastereomer 混合物 (3.33 g, 7.70 mmol, 収率 87%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

【 0 0 7 1 】

実施例 1 5. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-Obzlの合成

Boc-L-Ile-DL-Pip-OBzl (3.33 g, 7.70 mmol) をTFA (10 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応終了後TFAを留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ile-DL-Pip-OBzl · TFA を得た。これをDMF (16 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-OH (3.41 g, 11.6 mmol)を加え、続いて氷冷下HBTU (4.38 g, 11.6 mmol), HOBt · H₂O (1.18 g, 7.70 mmol) 及びトリエチルアミン(7.01 ml, 50.1 mmol)を加え、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10 %クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記diastereomer 混合物 (3.46 g, 5.67 mmol, 収率 74%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

【 0 0 7 2 】

実施例 1 6. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Ab7-Obzlの合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OBzl (3.46 g, 7.37 mmol) をメタノール (30 ml) に溶解し、5% Pd-C (230 mg) 存在下接触還元を行った。8時間後、Pd-C触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OHを得た。

Boc-L-Ab7-OBzl (3.05 g, 3.12 mmol) をTFA (5 ml) に溶解し、氷冷下30分間

放置した。反応終了後TFAを留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ab7-OBzl · TFA を得た。これをDMF (16 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OH (2.80 g, 5.39 mmol) を加え、続いて氷冷下HBTU (2.66 g, 7.01mmol), HOBT · H₂O (825 mg, 5.39 mmol) 及びトリエチルアミン(3.02 ml, 21.6 mmol) を加え、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記 diastereomer 混合物 (4.07 g, 4.91 mmol, 収率 91%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

【 0 0 7 3 】

実施例 1 7. H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Ab7-OH · TFAの合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-DL-Pip-OBzl (4.07 g, 4.91 mmol) をメタノール (10 ml) に溶解し、Pd-C触媒 (300 mg) 存在下接触還元を行った。8時間後、Pd-C触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OHを得た。これを TFA (10 mL) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応液を留去後、エーテル / 石油エーテル (1:10) を加えて固化し、減圧下乾燥後に標記diastereomer 混合物 (2.60 g, 3.51 mmol, 収率 72%) を得た。

【 0 0 7 4 】

実施例 1 8. Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) および Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-)の合成

鎖状テトラペプチド、H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Ab7-OH (1.28 g, 2.0 mmol), HATU (1.14 g, 3.0 mmol) 及び DIEA (1.0 ml) を5分割して 30 分毎に DMF (1000 ml) に加えて、環化反応を行った。2時間後、反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) を372 mg (61%, HPLC 保持時間、8.94 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 607 [M+H], (607.2)), Cyclo(-L-Ab7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-)を238 mg (39%, HPLC 保持時間、10.5 min., FAB-MS (dith

iodiethanol), 607 [M+H], (607.2)), それぞれフォーム状として得た。

【 0 0 7 5 】

実施例 1 9. Cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) の合成

cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) (130 mg, 0.21 mmol) の DMF (1 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (69 mg, 0.315 mmol) を加えて 3時間反応させた。反応液を留去し、反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄し、環化反応後と同様に生成したチオエステルを単離精製して 109 mg (86%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、8.94 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 603 [M+H], (603.3)。

【 0 0 7 6 】

実施例 2 0. Cyclo(-L-Am7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) (SS-dimer : SCOP 2 98) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) (114 mg, 0.198 mmol) のメタノール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去した。溶媒留去後 DMF (2 ml) に溶解し、1 M I_2 (エタノール) 0.2 5 ml を加えて酸化を行った。生成した SS dimer を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製した。水を加えて白色粉末として得た。収量 82 mg (78%)。HPLC 保持時間、11.6 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1063.5391 [M+H], $C_{54}H_{79}O_{10}N_8S_2$ (1063.5361)。

【 0 0 7 7 】

実施例 2 1. Cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) (240 mg, 0.40 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (69 mg, 0.60 mmol) を加えて 3時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮し、環化反応後と同様に生成したチオエステルを単離精製して 160 mg (66%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、10.5 min., FAB-MS (dithiodiethanol), 603 [M+H], (603.3)

【 0 0 7 8 】

実施例 2 2. Cyclo(-L-Am7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) (SS-dimer : SCOP 300) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) (160 mg, 0.27 mmol) の DMF (10 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去した。溶媒留去後 DMF (2 ml) に溶かし、1 M I_2 (エタノール) 0.31 ml を加えて酸化を行った。生成した SS dimer を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製した。水を加えて白色粉末として得た。収量 54 mg (36%)。HPLC 保持時間、13.4 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1119.5939 [M+H], $C_{58}H_{87}O_{10}N_8S_2$ (1119.5986).

【 0 0 7 9 】

実施例 2 3. Boc-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-D-Pro-OH (17.2 g, 80 mmol) とベンジルブロミド (14.3 ml, 120 mmol) とを DMF (160 ml) 中氷冷下でトリエチルアミン (16.8 ml, 120 mmol) 存在下で反応させ、Boc-D-Pro-OBzl を油状物として得た。これを 2 N HCl / ジオキサン (5 eq.) で 3 時間反応させて、H-D-Pro-OBzl · HCl を得た。

Boc-L-Ile-OH · 1/2 H_2O (24.0 g, 100 mmol), H-D-Pro-OBzl · HCl (19.3 g, 80 mmol) 及び HOBt · H_2O (15.3 g, 100 mmol) の DMF (200 ml) 溶液に氷冷下で DCU (8.3 g, 30 mmol) 及びトリエチルアミン (3.5 ml, 25 mmol) を加えた。8 時間攪拌後、DMF を留去し、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。 $MgSO_4$ で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1% メタノール / クロロホルム) で精製し、油状の標記化合物 (21.5 g, 51 mmol, 収率 72%) を得た。TLC: R_f = ($CHCl_3$ / MeOH = 9 / 1)

【 0 0 8 0 】

実施例 2 4. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-L-Ile-D-Pro-OBzl (21.5 g, 51.4 mmol) を TFA (50 ml) に溶解し、氷冷下 1 時間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ile-D-Pro-OBzl · TFA を得た。これを DMF (100 ml) に溶解させ、Boc-D-Tyr(Me)-OH (16.7 g, 56.5 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (29.4 g, 77 mmol), HOBt · H_2O (7.87 g,

51 mmol) 及びトリエチルアミン (25.2 ml, 180 mmol) を加え、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (22.0 g, 37 mmol, 収率 72 %) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

【 0 0 8 1 】

実施例 2 5. Boc-L-Ab6-OTmseの合成

Boc-L-Ab6-OH (620 mg, 2.0 mmol) とトリメチルシリルエタノール (0.572 ml, 4.0 mmol) とをDCM (6 ml) 中で4-ジメチルアミノピリジン (24.4 mg, 0.2 mmol) 存在下6時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、油状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 10% 酢酸エチル / ヘキサン) で精製し、油状の標記化合物 (820 mg, 1.62 mmol, 収率 81%) を得た。TLC: R_f = 0.97 (CHCl₃ / MeOH = 9 / 1)

【 0 0 8 2 】

実施例 2 6. Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro- L-Ab6-OTmse の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.01 g, 1.70 mmol) をメタノール (20 ml) に溶解し、5% Pd-C (150 mg) 存在下接触還元を行った。8時間後、Pd-C触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OHを得た。

Boc-L-Ab6-OTmse (1.51 g, 3.0 mmol) をTFA (5 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応終了後反応液を留去し、減圧下乾燥し、H-L-Ab6-OTmse · TFAを得た。これをDMF (3.5 ml) に溶解させ、氷冷下で4分割したBoc-D-Tyr(Me)- L-Ile-D-Pro-OH (819 mg, 1.62 mmol), HATU (776 mg, 2.0 mmol) 及びトリエチルアミン (0.24 ml, 1.7 mmol) を加え、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。無水MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、標記化合物 (888 mg, 1.09 mmol, 収率 64%) を得た。TLC: R_f = (CHCl₃ / Me

OH = 9 / 1)

【 0 0 8 3 】

実施例 2 7. Boc-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.19 g, 2.0 mmol) を TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl · TFA を得た。これを DMF (4.0 ml) に溶解させ、Boc-L-Ab7-OH (652 mg, 2.0 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (1.14 g, 3.0 mmol), HOBT · H₂O (306 mg, 2.0 mmol) 及びトリエチルアミン (1.4 ml, 10 mmol) を加え、3 時間撹拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.51 g, 1.89 mmol, 収率 94%) を得た。HPLC 保持時間、9.15 min.

【 0 0 8 4 】

実施例 2 8. Boc-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.19 g, 2.0 mmol) を TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl · TFA を得た。これを DMF (4.0 ml) に溶解させ、Boc-L-Ab8-OH (676 mg, 2.0 mmol) を加え、続いて氷冷下 HBTU (1.14 g, 3.0 mmol), HOBT · H₂O (306 mg, 2.0 mmol) 及びトリエチルアミン (1.4 ml, 10 mmol) を加え、3 時間撹拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.44 g, 1.76 mmol, 収率 88%) を得た。HPLC 保持時間、10.9 min.

【 0 0 8 5 】

実施例 2 9. Boc-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-Obzl の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.19 g, 2.0 mmol) を TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下 30 分間放置した。反応終了後 TFA を留去し、減圧下乾燥し、H-D-Tyr(M

e)-L-Ile-D-Pro-OBzl · TFA を得た。これをDMF (4.0 ml) に溶解させ、Boc-L-Ab 9-OH (775 mg, 2.2 mmol) を加え、続いて氷冷下HBTU (1.14 g, 3.0 mmol), HOBt · H₂O (306 mg, 2.0 mmol) 及びトリエチルアミン(1.4 ml, 10 mmol) を加え、3時間攪拌した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 2%メタノール / クロロホルム) で精製し、フォーム状の標記化合物 (1.31 g, 1.58 mmol, 収率 79%) を得た。HPLC 保持時間、11.7min.

【 0 0 8 6 】

実施例 3 0. H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OH · TFA の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OTmse (888 mg, 1.11 mmol) をエタノール (10 ml) に溶解し、氷冷下で3分割した1 N NaOH水溶液 (1.32 ml, 1.33 mmol) を加え、3時間放置した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮し、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OHを得た。これを TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応液を留去後、減圧下乾燥し、油状の標記化合物 (778 mg, 1.07 mmol, 収率 96%) を得た。

【 0 0 8 7 】

実施例 3 1. H-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH · TFA の合成

Boc- L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.51 g, 1.89 mmol) をメタノール (5 ml) に溶解し、5% Pd-C (150 mg) 存在下接触還元を行った。5時間後、Pd-C触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OHを得た。これを TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応液を留去後、減圧下乾燥し、油状の標記化合物 (1.15 mg, 1.84 mmol, 収率 97%) を得た。

【 0 0 8 8 】

実施例 3 2. H-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH · TFA の合成

Boc-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.44 g, 1.76 mmol) をメタノール (5 ml) に溶解し、5% Pd-C (150 mg) 存在下接触還元を行った。5時間後、Pd-C触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OHを得た。

これを TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応液を留去後、減圧下乾燥し、油状の標記化合物 (1.15 mg, 1.84 mmol, 収率 97%) を得た。

【 0 0 8 9 】

実施例 3 3. H-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH・TFAの合成

Boc-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.31 g, 1.58 mmol) をメタノール (2 ml) に溶解し、5% Pd-C (150 mg) 存在下接触還元を行った。12時間後、Pd-C 触媒を濾過し、反応液を留去後、Boc-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OHを得た。これを TFA (5 ml) に溶解し、氷冷下30分間放置した。反応液を留去後、エーテル / 石油エーテル (1:10) を加えて固化し、減圧下乾燥後に標記化合物 (905 mg, 1.42 mmol, 収率 90%) を得た。

【 0 0 9 0 】

実施例 3 4. Cyclo(-L-Ab6-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)の合成

H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OH・TFA (778 mg, 1.07 mmol), HATU (616 mg, 1.62 mmol) 及び DIEA (0.75 ml) を5分割して 30 分毎に DMF (110 ml) に加えて、環化反応を行った。2時間後溶媒を留去して残渣を酢酸エチルに取り、10% クエン酸、4% NaHCO₃、および食塩水で洗い、MgSO₄ で乾燥した。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、無色油状物 146 mg (23%) を得た。HPLC 保持時間、9.06 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 579.2197 [M+H], C₂₇H₄₁O₅N₄⁷⁹Br (579.2182)。

また、この時 Ab6 の側鎖末端 Br に置換して転移した HOAt adduct を含む環状テトラペプチド、cyclo(-L-A(OAt)6-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) 167 mg (27%) をフォームとして得た。HPLC 保持時間、8.16 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 635.3312 [M+H], C₃₂H₄₃O₆N₈ (635.3306)。

【 0 0 9 1 】

実施例 3 5. Cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)の合成

H-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH・TFA (1.15 g, 1.84 mmol), HATU (1.05 g, 2.76 mmol) 及び DIEA (1.28 ml) を5分割して30分毎に DMF (180 ml) に

加えて、環化反応を行った。上と同様に精製して 700 mg (64%) のフォームを得た。HPLC 保持時間、9.90 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 593.2300 [M+H], $C_{28}H_{42}O_5N_4^{79}Br$ (593.2339).

【 0 0 9 2 】

実施例 3 6. Cyclo(-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

H-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH · TFA (512 mg, 0.80 mmol), HATU (455 mg, 1.20 mmol) 及び DIEA (0.56 ml) を 5 分割して 30 分毎に DMF (80 ml) に加えて、環化反応を行った。2 時間後、反応液を濃縮し、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1% メタノール / クロロホルム) で精製し、267 mg (55%) のフォームを得た。HPLC 保持時間、9.95 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 607.2501 [M+H], $C_{29}H_{44}O_5N_4^{79}Br$ (607.2495).

【 0 0 9 3 】

実施例 3 7. Cyclo(-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

H-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH · TFA (905 mg, 1.41 mmol), HATU (833 mg, 2.12 mmol) 及び DIEA (0.64 ml) を 5 分割して 30 分毎に DMF (150 ml) に加えて、環化反応を行った。2 時間後、反応液を濃縮し、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮、フォーム状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1% メタノール / クロロホルム) で精製し、533 mg (61%) のフォームを得た。HPLC 保持時間、10.9 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 621.2625 [M+H], $C_{30}H_{46}O_5N_4^{79}Br$ (621.2652).

【 0 0 9 4 】

実施例 3 8. Cyclo(-L-Am6(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab6-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (146 mg, 0.252 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (57.6 mg, 0.504 mmol) を加えて 3 時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄ で乾燥後、濃縮し、環化反応後と同様に生成したチオエ

ステルを単離精製して 114 mg (79%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、9.06 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 575.2879 [M+H], $C_{29}H_{43}O_6N_4S$ (575.2903).

【 0 0 9 5 】

実施例 3 9. Cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab7-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (133 mg, 0.226 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液に チオ酢酸カリウム (52 mg, 0.452 mmol) を加えて 3 時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮し、生成したチオエステルを単離精製して 118 mg (89%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、9.90 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 589.3605 [M+H], $C_{30}H_{45}O_6N_4S$ (589.3060).

【 0 0 9 6 】

実施例 4 0. Cyclo(-L-Aa8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab8-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (267 mg, 0.439 mmol) の DMF (1 ml) 溶液に チオ酢酸カリウム (100 mg, 0.878 mmol) を加えて 3 時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮し、生成したチオエステルを単離精製して 222 mg (84%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、9.95 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 603.3244 [M+H], $C_{31}H_{47}O_6N_4S$ (603.3216).

【 0 0 9 7 】

実施例 4 1. Cyclo(-L-Am9(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab9-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (250 mg, 0.402 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にチオ酢酸カリウム (91.4 mg, 0.804 mmol)を加えて 3 時間反応させた。反応液を濃縮後、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。MgSO₄で乾燥後、濃縮し、生成したチオエステルを単離精製して 190 mg (77%) の油状物を得た。HPLC 保持時間、10.9 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 617.3364 [M+H], $C_{32}H_{49}O_6N_4S$ (617.3373).

【 0 0 9 8 】

実施例 4 2. Cyclo(-L-Am6(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) SS dimer (SCOP 302) の合成

cyclo(-L-Am6(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (114 mg, 0.198 mmol) のメタノール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去した。溶媒留去後 DMF (2 ml) に溶かし、1 M I_2 (エタノール) 0.2 ml を加えて酸化を行った。生成した SS dimer を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製した。水を加えて白色粉末として得た。収量 82 mg (78%)。HPLC 保持時間、11.6 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1063.5391 [M+H], $C_{54}H_{79}O_{10}N_8S_2$ (1063.5361).

【 0 0 9 9 】

実施例 4 3. Cyclo(-L-Am7(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) SS dimer (SCOP 304) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (118 mg, 0.201 mmol) のメタノール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニアを作用させてアセチル基を除去し、1 M I_2 (エタノール) を加えて末端スルフィドリル基を酸化し、精製して SS dimer を白色粉末として得た。収量 98 mg (89%)。HPLC 保持時間、12.3 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1091.5684 [M+H], $C_{56}H_{83}O_{10}N_8S_2$ (1091.5674).

【 0 1 0 0 】

実施例 4 4. Cyclo(-L-Am8(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) SS dimer (SCOP 306) の合成

cyclo(-L-Am8(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (222 mg, 0.368 mmol) のメタノール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニアを作用させてアセチル基を除去し、1 M I_2 (エタノール) を加えて末端スルフィドリル基を酸化し、精製して SS dimer を白色粉末として得た。収量 167 mg (81%)。HPLC 保持時間、13.0 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1119.5961 [M+H], $C_{58}H_{86}O_{10}N_8S_2$ (1119.5987).

【 0 1 0 1 】

実施例 4 5. Cyclo(-L-Am9(-)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) SS dimer (SCOP 308) の合成

cyclo(-L-Am9(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (95 mg, 0.154 mmol) のメタノ

ール (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニアを作用させてアセチル基を除去し、1 M I_2 (エタノール) を加えて末端スルフィドリル基を酸化し、精製して SS dimer を白色粉末として得た。収量 84 mg (98%)。HPLC 保持時間、14.2 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 1147.6307 [M+H], $C_{60}H_{91}O_{10}N_8S_2$ (1147.6300).

【 0 1 0 2 】

実施例 4 6. Cyclo(-L-Am7(SMEt)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (SS hybrid : SC OP 404) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (270 mg, 0.45 mmol) の DMF (0.5 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (10 eq.) を作用させてアセチル基を除去し、アンモニアを留去後、2-メルカプトエタノール (10 eq.) を加え、1 M I_2 (エタノール) 0.2 ml を加えて酸化を行った。生成した SS hybrid を Sephadex LH-20 (DMF) カラムで精製し、凍結乾燥を行い、標記化合物を白色粉末として得た。収量 30 mg (11 %)。HPLC 保持時間、8.9 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 622.2877 [M], $C_{30}H_{46}O_6N_4S_2$ (622.2859).

【 0 1 0 3 】

実施例 4 7. Cyclo(-L-Am7(S2Py)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (SS hybrid : SC OP 401) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (40 mg, 0.07 mmol) の DMF (1 ml) 溶液に 2,2'-ジチオピリジン (31 mg, 0.14 mmol) 及びメタノール性アンモニア (10 eq.) を加え、8時間攪拌した。反応液を濃縮後、粉状物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1 %メタノール / クロロホルム) で精製し、標記化合物を得た。収量 15 mg (38%)。HPLC 保持時間、9.6 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 656.2952 [M+H], $C_{33}H_{45}O_5N_5S_2$ (656.2940).

【 0 1 0 4 】

実施例 4 8. Cyclo(-L-Am7(S4Py)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (SS hybrid : SC OP 402) の合成

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (100 mg, 0.17 mmol) の DMF (1 ml) 溶液に 4,4'-ジチオピリジン (75 mg, 0.34 mmol) 及びメタノール性アンモニア (20 eq.) を加え、8時間攪拌した。反応液を濃縮後、粉状物をフラッシュ

シリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1 %メタノール / クロロホルム) で精製し、標記化合物を得た。収量 13 mg (13%)。HPLC 保持時間、6.5 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 656.2934 [M+H], $C_{33}H_{45}O_5N_5S_2$ (656.2940)。

【 0 1 0 5 】

実施例 4 9. Cyclo(-L-Am7(SE11)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (SS hybrid : SCOP 403) の合成

5,5'-ジチオビス(2-ニトロベゼン酸) (515 mg, 1.4 mmol) のDMF (2.8 mL) 溶液に、氷冷下ジメチルアミン (343 mg, 3.0 mmol), DCC (867 mg, 3.0 mmol) 及びHOBt・H₂O (214 mg, 1.4 mmol)を加え、8時間攪拌した。反応終了後反応液を濃縮し、酢酸エチルに溶解し、10%クエン酸水溶液、4%炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。無水MgSO₄で乾燥した後、酢酸エチルを除去した。真空乾燥後、フラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (4×30 cm, 1%メタノール / クロロホルム) で精製し、5,5'-ジチオビス(2-ニトロベゼン酸ジメチルアミド)を得た。

cyclo(-L-Am7(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (130 mg, 0.22 mmol) のDMF (2 mL) 溶液に5,5'-ジチオビス(2-ニトロベゼン酸ジメチルアミド) (198 mg, 0.44 mmol) 及びメタノール性アンモニア (10 eq.) を加え、6時間攪拌した。反応液を濃縮後、少量のDMFに溶かし、HPLC (column : YMC-Pack ODS-A 10×250 mm) で精製し、標記化合物を得た。収量 13 mg (9.3%)。HPLC 保持時間、9.5 min., HRMS (FAB, dithiodiethanol), 771.3201 [M+H], $C_{37}H_{50}O_8N_6S_2$ (771.3210)。

【 0 1 0 6 】

実施例 5 0. HDAC 酵素阻害活性の測定

本実施例ではSCOPのHDAC酵素阻害活性の測定を行った。活性を測定したSulfur-containing cyclic peptides (SCOP)の構造の一覧を図1～4に示す。天然のHDAC阻害剤である図5に示すようなCyl-1, Cyl-2 (Furumai et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 87-92.) を元に環状テトラペプチド構造のコンフォメーション及び活性基までの炭素鎖数を検討した。

【 0 1 0 7 】

天然のCyl-1, Cyl-2は立体コンフォメーションがLDLL体であるが、LDLDのコン

フォメーションを持つものについても検討した。なお、以下に示す実験結果において、X = Hではジスルフィド結合を切断するため、DTTを共存させている。

【0108】

HDAC阻害活性測定を行うにあたり、次の通りHDAC溶液を調製した。100 mmディッシュに 1×10^7 個の293T細胞をまき、24時間後にヒトHDAC1、4またはマウスHDAC6を発現するベクター ($1 \mu\text{g}$) をLipofectAmine 2000 reagent (Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) を用いてトランスフェクションした。なお、上記ヒトHDAC1発現ベクターはp cDNA3-HD1 (Yang, W. M., Yao, Y. L., Sun, J. M., Davie, J. R. & Seto, E. (1997) J. Biol. Chem. 272, 28001-28007.)、ヒトHDAC4発現ベクターはp cDNA3.1 (+)-HD4 (Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M. J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W. & Verdin, E. (1999) J. Biol. Chem. 274, 11713-11720.)、マウスHDAC6発現ベクターはp cDNA-mHDA2/HDAC6 (Verdel, A. & Khochbin, S. (1999) J. Biol. Chem. 274, 2440-2445.) を用いた。OPTI-MEM中で5時間ベクターを取り込ませた後、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に培地を交換して19時間インキュベートした。細胞をPBSで洗った後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40) に懸濁し、ソニケーションした。上清を遠心分離により集め、ProteinA/G plus agarose beads (Santa Cruz Biotechnologies, Inc.) を用いて、非特異的タンパクを除いた。その後、HDAC1、HDAC4を発現させた細胞上清には、anti-FLAG M2抗体 (Sigma-Aldrich Inc.) を加え、HDAC6を発現させた細胞上清にはanti-HA抗体 (clone 3F10, Roche Molecular Biochemicals) を加えて4℃で1時間反応させた。これにアガロースビーズを加えて4℃で1時間反応させた後、lysis bufferでアガロースビーズを3回洗い、HD buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10%グリセロール, a complete protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim, Germany)) で一回洗った。HD buffer ($200 \mu\text{l}$) 中FLAGペプチド ($40 \mu\text{g}$) (Sigma-Aldrich Inc.) またはHAペプチド ($100 \mu\text{g}$)

）で4℃、1時間インキュベートしてアガロースビーズから結合したタンパクを回収し、HDAC反応溶液とし、以下のHDAC阻害活性測定に用いた。

【0109】

インビトロのHDAC阻害活性を以下のように評価した。被験化合物をDMSOに溶解して濃度10mMとして、これを阻害剤の原溶液とした。陽性コントロールとしてHDAC酵素阻害剤として知られているトリコスタチンA (TSA) をDMSOに溶解して、濃度10mMの原溶液を調製した。測定は被験化合物またはコントロールのTSA存在下、上記HDAC溶液と $[^3\text{H}]$ で標識したアセチル化ヒストン基質溶液を37℃で15分間インキュベートすることで行った（反応容積100 μl ）。反応を10 μl のHClを添加して止め、酵素反応で切り出された $[^3\text{H}]$ 酢酸を酢酸エチルで抽出して放射活性を測定した。なお、陰性コントロールとして、阻害剤を反応系に添加せず、同じ操作を行った。阻害活性は、陰性コントロールにおけるHDAC活性の50%阻害濃度（「IC50 (nM)」）で表した（表1～4）。

【0110】

また、*in vivo*のHDAC阻害活性はp21プロモーター誘導活性を指標に次の通り測定した。実験に用いたMFL-9細胞はヒト野生型p21プロモーターとルシフェラーゼの融合遺伝子 (Dr. B. Vogelstein) を安定に保持した細胞であり、10%FBSを添加したフェノールレッド不含DMEM培地を用い、37℃、5%二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。このMFL-9細胞を85000個/wellの細胞密度で96穴マイクロプレートに播種し、各well当たり上記の培地99 μl 中で、6時間培養した後、被験化合物溶液1 μl を添加し、引き続き18時間培養した。また、ここでもTSAをHDAC阻害活性に起因するp21プロモーター誘導活性の陽性コントロール化合物とした。

【0111】

Luc Lite (Packard BioScience Company) を用い、細胞内に発現しているルシフェラーゼの酵素反応の生成物に起因する発光強度を測定した。なお、被験化合物の添加量を零とした群を陰性コントロール群とし、この群における測定値を基準値とした。各被験化合物の添加濃度における活性は、前記の基準値を1とす

る相対値で表した。被験化合物の活性強度はTSAによる最大活性値の50%の値を示す時の濃度(「EC50 (nM)」)を用いて比較した(表1~4)。

【0112】

【表1】

X = Hである。

阻害剤 SCOP No.	IC50 (nM)			P21 プロモータ		構造	炭素鎖数
	HDAC1	HDAC4	HDAC6	EC50 (nM)			
148	81.4	17.0	> 500000	6720		Cyl1(LDLL)	C5
149	2.37	5.22	44300	596		Cyl2(LDLL)	C5
150	2.10	4.26	5560	504		Cyl2(LDLD)	C5
151	932	7340	28500	> 100000		Cyl1(LDLD)	C4
152	4.60	2.06	1400	309		Cyl1(LDLD)	C5
153	9.13	91.0	8050	9850		Cyl1(LDLD)	C6
154	38.1	99.2	2470	31400		Cyl1(LDLD)	C7

【0113】

表1のインビトロの阻害活性、インビボのP21プロモータ活性で示される通り、天然型コンフォメーションであるLDLL体よりもLDLD体の方がより活性が高く、活性基であるチオール基までの炭素鎖数はC5のものが最適であることがわかった。

【0114】

【表2】

X = 左の構造を持つ化合物(ホモダイマー)

阻害剤 SCOP No.	IC50 (nM)			P21 プロモータ		構造	炭素鎖数
	HDAC1	HDAC4	HDAC6	EC50 (nM)			
296	763	222	> 500000	7730		Cyl1(LDLL)	C5
298	114	33.7	418000	5800		Cyl2(LDLL)	C5
300	61.1	36.2	255000	7370		Cyl2(LDLLD)	C5
302	7200	> 500000	> 500000	> 100000		Cyl1(LDLLD)	C4
304	142	145	> 500000	341		Cyl1(LDLLD)	C5
306	153	319	1320000	847100000		Cyl1(LDLLD)	C6
308	983	505	745000	235000		Cyl1(LDLLD)	C7

【 0 1 1 5 】

X = Hの時と同様、ホモダイマーにおいても天然型コンフォメーションであるLDLL体よりもLDLD体の方が高活性で、活性基であるチオール基までの炭素鎖数はC5のものが最適であることが示された。

【 0 1 1 6 】

【表 3】

X = 低分子化合物 (hybrid)

阻害剤 SCOP No.	IC50 (nM)			P21 プロモータ		構造
	HDAC1	HDAC4	HDAC6	EC50 (nM)		
401	NT	NT	NT	1360		152 + 2-Pyridine
402	6.76	68.3	1610	1310		152 + 4-Pyridine
403	21.5	18.9	6080	1800		152 + Ellman's reagent
404	217	355	201000	1360		152 + mercaptoethanol
401/DTT	NT	NT	NT	815		
402/DTT	0.553	1.12	2010	470		
403/DTT	1.15	1.53	4730	748		
404/DTT	2.44	13.0	15400	754		

(NT: No tested)

【 0 1 1 7 】

SCOP 1 5 2 と低分子化合物とのhybrid体でも阻害活性を有することが示された。

【 0 1 1 8 】

【表 4】

陽性コントロール (TSA)

阻害剤	IC50 (nM)			P21 プロモータ
	HDAC1	HDAC4	HDAC6	EC50 (nM)
TSA	19.2	68.3	27.2	445

【 0 1 1 9 】

以上の結果より、天然型コンフォメーションであるLDLL体よりもLDLD体の方が高活性である。更に、活性基であるチオール基までの炭素鎖数はC5のものが最適であることがわかった。また、HDAC6に対する阻害活性がかなり低いことから、酵素サブタイプ選択的な阻害活性を持つことが示された。また、今回の化合物は酵素レベルではDTT共存下チオール体 (X = H) の時に高いHDAC阻害活性を持つ。これに対し、細胞レベルではX = 左の構造を持つ化合物、X = 低分子化合物の時でも高活性を示している。細胞内に取り込まれたジスルフィド体が細胞内の還元力により還元されチオール基が露出して活性化したと考えられる。

【 0 1 2 0 】

実施例 5 1. 細胞レベルでのHDAC阻害活性の測定

ヒストンアセチル化レベルの測定は、HeLa細胞に対して被験化合物を作用させ、抗アセチル化リジン抗体を使用してヒストンのアセチル化レベルをウェスタンで確認することにより行った。詳細には、ヒト子宮がん細胞 (HeLa) は10%FBSを添加したDMEM培地を用い、37℃、5%二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。この細胞を15000個/mlの細胞密度で6穴プレートに2 ml播種し、18時間培養した後、被験化合物溶液を添加し、引き続き6時間培養した。細胞をPBSで洗った後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、120 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5% Nonid

e t P-40) に懸濁し、ソニケーションした。上清を遠心分離により集め、SDS bufferと混合し、100℃で5分間処理したサンプルを15%SDSゲルで電気泳動後、メンブレンフィルムにトランスファーした。1次抗体としてAKL5C1(ジャパンエナジー)、2次抗体: anti-マウス(LIFE SCIENCE)で処理後ECL(amersham pharmacia biotech)処理し、アセチル化バンドの検出を行った(図6)。なお、図6において記載している化合物の濃度の単位はnMである。

【0121】

図6に示す通り、p21プロモーター誘導活性測定の結果(EC50)と一致した阻害傾向が示された。活性基であるチオール基までの炭素鎖数はC5のものが最適である。

【0122】

実施例52. 細胞毒性テスト

SCPOの細胞毒性テストをヒト肺正常細胞(TIG-3)、ヒト子宮がん細胞(HeLa)を用いて行った。これらTIG-3細胞、HeLa細胞を10%FBSを添加したDMEM培地を用い、37℃、5%二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。TIG-3は30000個/well、HeLaは10000個/wellの細胞密度で96穴マイクロプレートに播種し、各well当たり上記の培地100 μ l中で18時間培養した後、培地に希釈した被験化合物溶液を添加し、引き続き48時間培養した。

【0123】

各wellの上清30 μ lを別の96穴マイクロプレートに移し(A)、残った上清を除いた。そこに、0.5%Triton-X / PBS を100 μ l加えて、細胞を溶解させ、さらに別の96穴マイクロプレートに30 μ lずつ移した(B)。これらの96穴マイクロプレートA, Bの各wellにLDH-Cytotoxic Test (Wako)の基質溶液を30 μ lずつ入れ、呈色反応をさせた。十分な呈色反応が進んだら、反応停止液60 μ lを加えて呈色反応を停止させた。OD560 nmの発色強度をマイクロプレートリーダー(Softmax)で測定した。遊離LDH率として[A/(A+B)]を求めた。阻害活性は、遊離LDH率50%となるときの濃度をLD50として示した。なお、がん細胞選択的細胞傷害活性の値(正常細胞LD50 / がん細胞LD50)が高いほど、がん細胞選択的に細胞死を誘導していることを示す。

【0124】

【表5】

阻害剤	LD50 (nM)		がん細胞選択的 細胞傷害活性
	HeLa	TIG-3	
TSA	41.4	1580	38.2
SCOP 152	225	6160	27.4
SCOP 304	151	3471	23.0
SCOP 402	1090	12800	11.7
SCOP 402/DTT	<1	4160	>4160

【0125】

上記表5に示されている通り、今回の化合物はTSAとほぼ同程度のがん細胞選択的に強い細胞傷害活性を有することが示された。

【0126】

実施例53. 安定性の評価

SCOP 152とSCOP 304の血清中での安定性の評価は以下の方法で行った。FCS 99 μ l中にSCOP 152及びSCOP 304 (10 mM)を1 μ l加えて37℃でインキュベートした。これを時間ごとに1 mlの酢酸エチルと飽和のために十分な量のNaClを加えて抽出した。この酢酸エチル相800 μ lをとり、酢酸エチルを留去した後DMSO 100 μ lを加えて溶解させた。この溶液を更にDMSOで10倍希釈したものをを用いてp21プロモータ誘導活性の測定を行った。インキュベート時間0の活性を100%として活性を比較した(図7)。

【0127】

図7に示す通り、血清中でSCOP 304はSCOP 152よりも長時間安定に活性を保持できることが示された。これはチオール基が保護されたことにより安定性が上昇したと考えられる。

【0128】

本発明の化合物はHDAC1, 4に対しては強い阻害活性を示したが、HDAC6に対してはほとんど阻害活性を持たなかった。HDAC6は精巢などで発現が高く、正常な

組織の分化に関わると推定されるが、発がんとの関わりは示されておらず、HDAC 6を阻害することは副作用につながる可能性が考えられる。本発明の化合物にはHDAC6阻害作用が非常に弱く、TSAにないサブタイプ選択性があることから新しい阻害剤として有用である。更に今回の化合物はテトラペプチド骨格の構造を容易に変えることができるため、さらなる選択性を持たせることができると期待される。

【0129】

【発明の効果】

上述の通り、本発明のHDAC阻害剤は、HDAC 1, 4 に対して選択的に強い阻害活性を示す。従って、本発明のHDAC阻害剤は、HDAC、とりわけ、HDAC1,4に参与している疾患の治療薬として、利用し得る。また、本発明のHDAC阻害剤の製造方法は、原料として2-アミノ-n-ハロアルカン酸を用いることにより、種々のHDAC阻害剤を簡便に合成することができる。そのため、本発明の製造方法を用いることにより、より選択性の高いHDAC阻害剤などの開発に寄与することが期待される。

【0130】

【図面の簡単な説明】

【図1】 活性基であるチオール基までの炭素鎖数5のLDLD体あるいはLDLL体のSCOPの構造の一覧を示す。

【図2】 活性基であるチオール基までの炭素鎖数4～7のSCOPの構造を示す。なお、図においてSCOP152 (C5)は、図1と重複して示す。

【図3】 ホモダイマー型のSCOPの構造を示す。なお、SCOP番号はモノマーの番号を2倍して表示している。

【図4】 SCOP 152に種々の化合物を結合させたハイブリッド型のSCOPの構造を示す。

【図5】 天然のCyl-1, Cyl-2は立体コンフォメーションを示す。

【図6】 細胞内でのヒストンアセチル化レベルを抗アセチル化リジン抗体を用いたウェスタンにより測定した結果を示す。

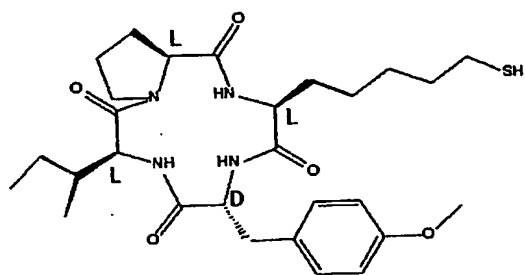
【図7】 SCOP 152とSCOP 304の血清中での安定性を評価を行った結果を示す。

特 2 0 0 2 - 0 4 4 0 0 0

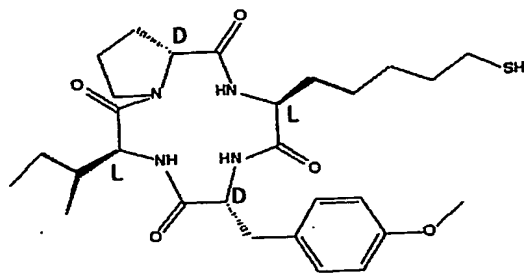
す。

【書類名】 図面

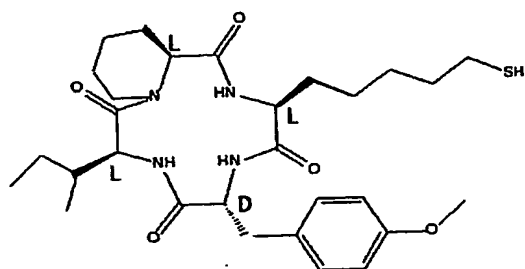
【図 1】



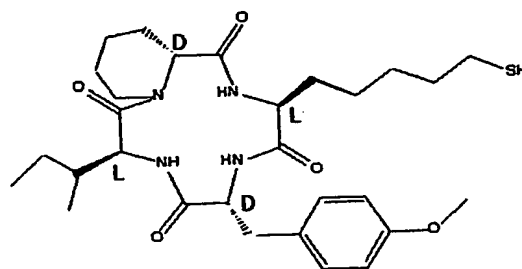
SCOP 148
Cyl-1 type, LDLL, C5
cyclo(-LAm7-DTyr(Me)-Llle-LPro-)



SCOP 152
Cyl-1 type, LDLD, C5
cyclo(-LAm7-DTyr(Me)-Llle-DPro-)

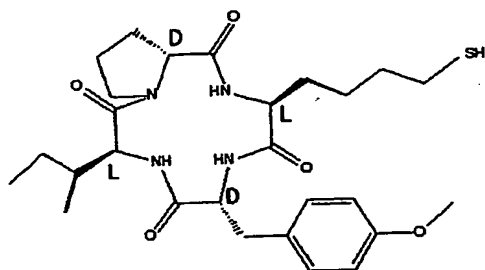


SCOP 149
Cyl-2 type, LDLL, C5
cyclo(-LAm7-DTyr(Me)-Llle-LPip-)

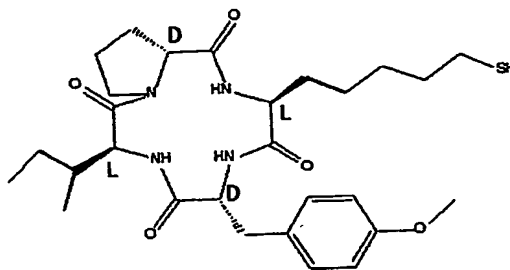


SCOP 150
Cyl-2 type, LDLD, C5
cyclo(-LAm7-DTyr(Me)-Llle-DPip-)

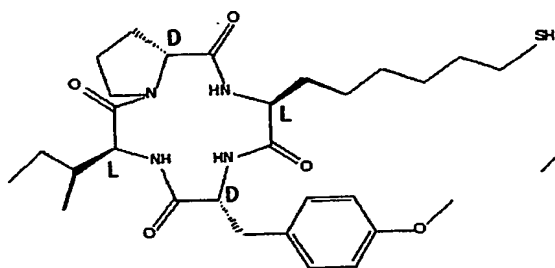
【図 2】



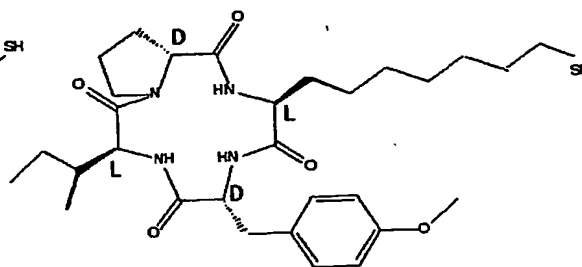
SCOP 151
Cyt-1 type, LDLD, C4
cyclo(-LAM6-DTyr(Me)-Llle-DPro-)



SCOP 152
Cyt-1 type, LDLD, C5
cyclo(-LAM7-DTyr(Me)-Llle-DPro-)

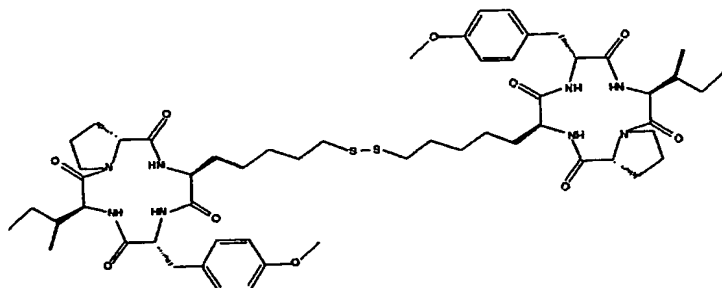


SCOP 153
Cyt-1 type, LDLD, C6
cyclo(-LAM8-DTyr(Me)-Llle-DPro-)

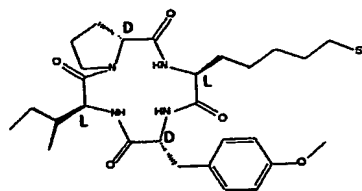


SCOP 154
Cyt-1 type, LDLD, C7
cyclo(-LAM9-DTyr(Me)-Llle-DPro-)

【図 3】

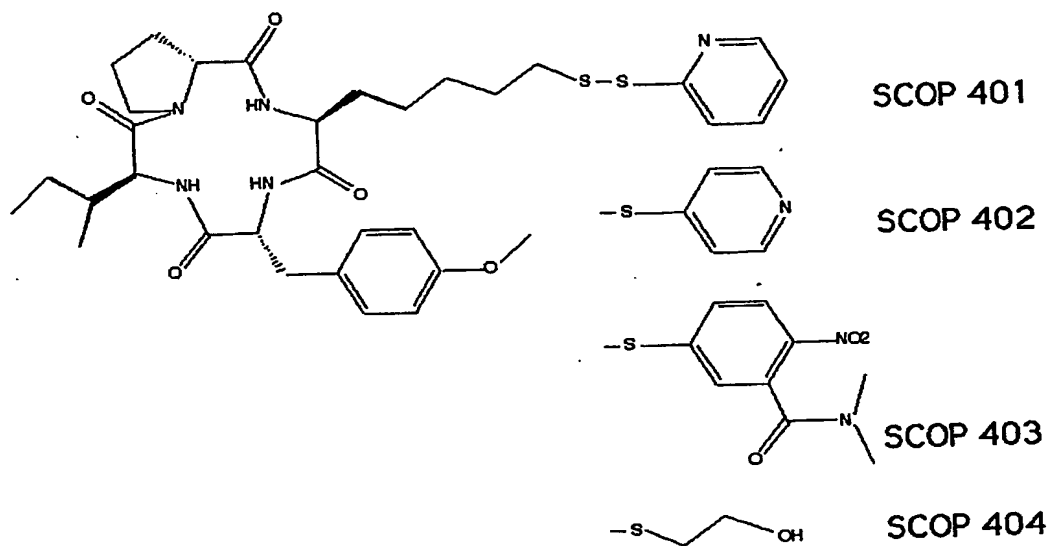


SCOP 304
SCOP 152のホモダイマー

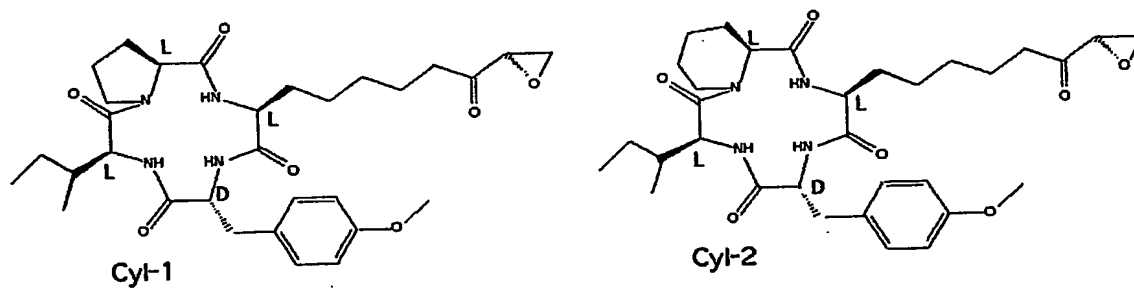


SCOP 152
Cyt-1 type, LDLD, C5
cyclo(-LAM7-DTyr(Me)-Llle-DPro-)

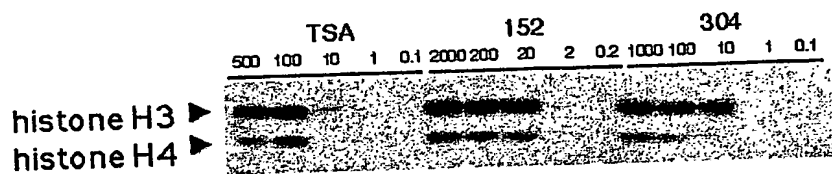
【図 4】



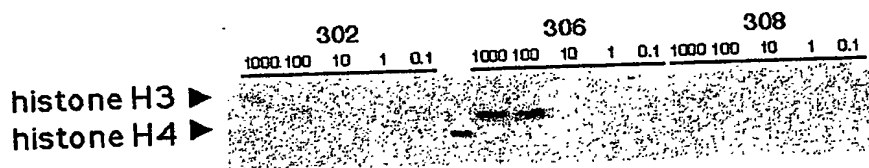
【図 5】



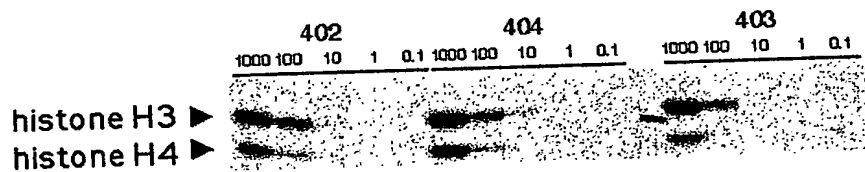
【図 6】



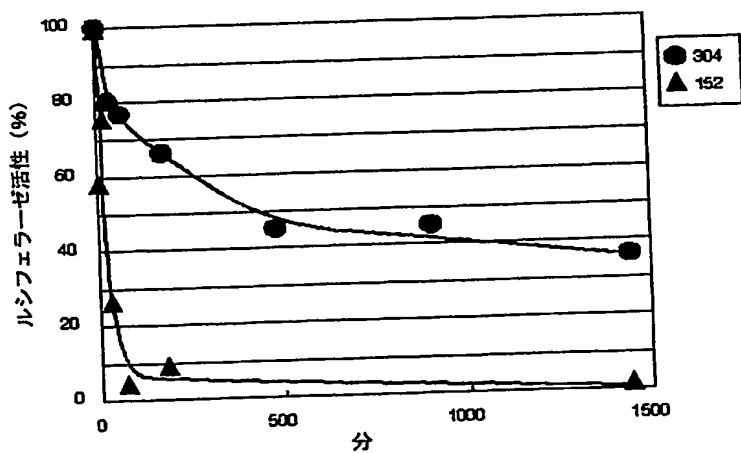
(B)



(C)



【図 7】

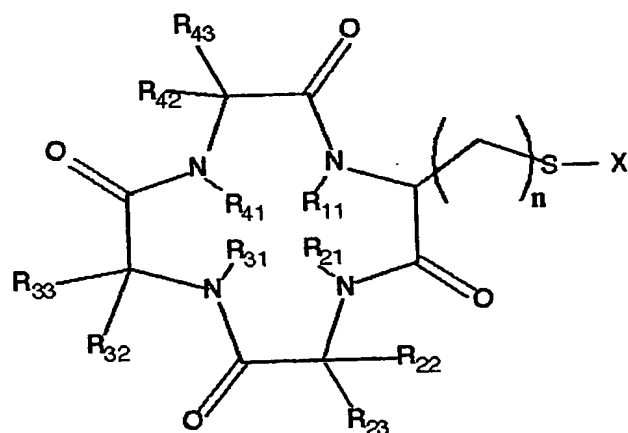


【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 環状テトラペプチド構造を備えた新規なHDAC阻害剤を提供する。

【解決手段】 一般式(1)で示されるHDAC阻害剤は、HDAC1,4に対して選択的に強い阻害活性を備えている。そのため、本発明のHDAC阻害剤はHDAC1,4に起因した疾患の治療薬として有用となる。



(1)

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502062434]

1. 変更年月日	2002年 2月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県川口市安行655-21
氏 名	吉田 稔

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502063109]

1. 変更年月日 2002年 2月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 福岡県北九州市若松区畠田1-6-6

氏 名 西野 憲和

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502063110]

1. 変更年月日

2002年 2月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都江東区越中島1-3-16-403

氏 名

堀之内 末治